

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/52, 15/68, 15/74, C12P 19/42, C12N 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:38)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/13813
			(43) Date de publication internationale: 23 juin 1994 (23.06.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01202		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 7 décembre 1993 (07.12.93)		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(30) Données relatives à la priorité: 92/14814 9 décembre 1992 (09.12.92) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC BIOCHIMIE [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 48-52, rue des Meuniers, F-75012 Paris (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).			

(54) Title: CELLS WITH ALTERED BETAINES CATABOLISM, THEIR PREPARATION AND THEIR USE, IN PARTICULAR FOR PRODUCING METABOLITES OR ENZYMES

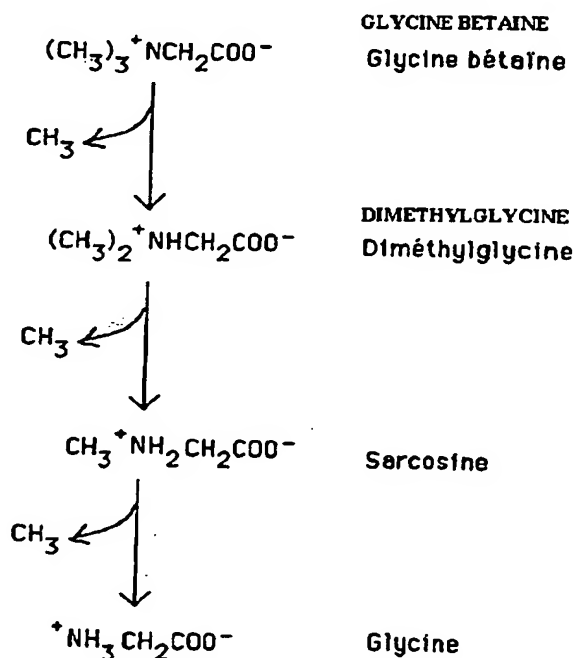
(54) Titre: CELLULES MODIFIEES AU NIVEAU DU CATABOLISME DE LA BETAINE, PREPARATION ET UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA PRODUCTION DE METABOLITES OU D'ENZYMES

(57) Abstract

Cells with an alteration at least in the gene involved in betaine catabolism, their preparation and their use, in particular for producing metabolites and/or enzymes, are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des cellules présentant une modification au moins au niveau d'un gène impliqué dans le catabolisme de la bétaine. Elle concerne également leur préparation et leur utilisation, notamment pour la production de métabolites et/ou enzymes.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

CELLULES MODIFIEES AU NIVEAU DU CATABOLISME DE LA BETAINE,
PREPARATION ET UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA PRODUCTION
DE METABOLITES OU D'ENZYMES

La présente invention concerne des cellules modifiées au niveau du
5 catabolisme de la bétaine, leur préparation et leur utilisation, notamment pour la
production améliorée de métabolites et/ou d'enzymes. L'invention concerne également
des fragments d'ADN portant des gènes du catabolisme de la bétaine.

La glycine bétaine (N,N,N-triméthylglycine) est généralement connue pour
ses propriétés osmoprotectrices, conférant aux bactéries une tolérance au stress
10 osmotique (Csonka, 1989). Pour expliquer l'origine de cette propriété, il a été proposé
que les effets moléculaires de la glycine bétaine sur l'activité de l'eau et sur la pression
osmotique du cytoplasme chez *Escherichia coli* étaient plus importants que ceux des
solutés qu'elle remplace (Cayley et al, 1992). De plus, en dehors de ses potentialités
osmoprotectrices, il a été décrit que la glycine bétaine pouvait également favoriser la
15 production d'enzymes (JP 8260709) ou de métabolites, tels que des acides aminés
(brevet JP 202703) ; des antibiotiques (brevet AU 825513) et des vitamines (White et
al, 1971). Toutefois, la plupart des bactéries sauf les cyanobactéries et d'autres
procaryotes fixant le CO₂, ne synthétisent pas la glycine bétaine, qui est
principalement synthétisée par les plantes. Celle-ci doit donc être ajoutée aux milieux
20 de production dans les fermenteurs, ce qui génère un coût supplémentaire dans un
procédé industriel. La présente invention apporte une solution à ce problème.

La demanderesse a en effet démontré qu'il est possible, en modifiant le
catabolisme de la bétaine des cellules, notamment par des moyens génétiques, de
potentialiser l'effet de ce composé sur la production d'enzymes ou de métabolites sans
25 affecter la vitesse de croissance des cellules, leur viabilité, etc, dans des conditions
industrielles de fermentation. La demanderesse a également identifié, isolé et
caractérisé des fragments d'ADN contenant des gènes impliqués dans le catabolisme
de la bétaine, qui permettent notamment de préparer des cellules spécifiquement
modifiées au niveau du catabolisme de la bétaine, et dont les modifications sont
30 stables ségrégationnellement et non réversibles. Ces fragments permettent également
de stimuler le catabolisme de la bétaine par amplification des activités enzymatiques
appropriées. La présente invention permet donc de potentialiser les effets de la bétaine
et, de ce fait, d'utiliser ce composé de manière économique dans des procédés
industriels de fermentation.

Un premier objet de l'invention concerne donc une cellule modifiée, présentant une modification au moins au niveau d'un gène impliqué dans le catabolisme de la bétaine.

Dans un premier mode particulier de réalisation, le terme cellule modifiée
5 désigne plus particulièrement toute cellule présentant une substitution et/ou une délétion et/ou une insertion d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés et dégradant moins rapidement la bétaine. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur les fragments d'ADN isolés portant des gènes du catabolisme de la bétaine) ou in situ, par exemple, au moyen des techniques du génie génétique, ou
10 encore en exposant lesdites cellules à un traitement au moyen d'agents mutagènes.

Par agents mutagènes, on peut citer par exemple les agents physiques tels que les rayonnements énergétiques (rayons X, g, ultra violet, etc.), ou les agents chimiques capables de réagir avec différents groupements fonctionnels des bases de l'ADN, et par exemple les agents alkylants [éthylméthane sulfonate (EMS), N-méthyl-
15 N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-nitroquinoléine-1-oxyde (NQO)], les agents bialkylants, les agents intercalants, etc...

Par délétion on entend la suppression de tout ou partie du gène considéré. Il peut s'agir notamment d'une partie de la région codante et/ou de tout ou partie de la région promotrice de la transcription.

20 Les modifications génétiques peuvent également être obtenues par disruption génique, par exemple selon le protocole initialement décrit par Rothstein (1983). Dans ce cas, tout ou partie du gène est préférentiellement perturbé pour permettre le remplacement, par recombinaison homologue, de la séquence génomique sauvage par une séquence non fonctionnelle ou mutante préparée in vitro.

25 La ou lesdites modifications peuvent être localisées dans la partie codante du gène ou dans les régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle desdits gènes. L'incapacité (totale ou partielle) desdites cellules à dégrader la bétaine peut se manifester soit par la production d'enzymes inactives en raison de modifications structurales ou conformationnelles, soit par l'absence de
30 production, soit par la production d'enzymes ayant une activité altérée, ou encore par la production d'enzymes naturelles à un niveau atténué ou selon un mode de régulation désiré.

Par ailleurs, certaines modifications telles que des mutations ponctuelles sont par nature capables d'être corrigées ou atténuées par des mécanismes cellulaires, par
35 exemple lors de la réplication de l'ADN précédant la division cellulaire. De telles

modifications génétiques ont alors un intérêt limité au niveau industriel puisque les propriétés phénotypiques qui en résultent ne sont pas parfaitement stables. Selon la présente invention, il est maintenant possible grâce à l'identification de fragments d'ADN portant des gènes du catabolisme de la bétaine, de préparer des cellules
5 modifiées dans lesquelles la ou lesdites modifications sont stables ségrégonnellement et/ou non-réversibles. Les cellules présentant de telles modifications sont particulièrement avantageuses comme hôte cellulaire pour la production de métabolites et/ou d'enzymes.

Dans un autre mode particulier de réalisation, les cellules modifiées de
10 l'invention sont des cellules dans lesquelles un gène au moins impliqué dans le catabolisme de la bétaine est amplifié, et qui dégradent de ce fait plus rapidement la bétaine.

L'amplification peut être obtenue par introduction dans la cellule d'un fragment d'ADN portant un gène du catabolisme de la bétaine. Ce fragment fait
15 préférentiellement partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Par ailleurs, le fragment d'ADN peut être homologue ou hétérologue vis-à-vis de la cellule modifiée, c'est-à-dire que le ou les gènes amplifiés peuvent être des gènes de la dite cellule ou des gènes provenant d'autres sources cellulaires et codant pour une activité de même type. Le choix du vecteur et de l'origine du fragment
20 amplifié dépend des cellules considérées et des applications envisagées. Le fragment d'ADN peut être introduit dans les cellules par toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

25 D'après les études, effectuées essentiellement chez Rizobium meliloti ; la dégradation de la glycine bétaine se réalise sur des milieux de faible osmolarité, par trois déméthylations successives (voir figure 1). La première étape est catalysée par la bétaine-homocystéine méthyltransférase E.C. 2.1.1.5. et conduit à la diméthylglycine ; la deuxième est catalysée par la diméthylglycine déshydrogénase E.C. 1.5.99.2. et
30 génère la monométhylglycine ou sarcosine ; enfin la troisième est catalysée par la sarcosine déshydrogénase E.C. 1.5.99.1 et le produit de la réaction est la glycine (Smith et al, 1988).

Préférentiellement, les modifications que présentent les cellules de l'invention affectent l'une des deux premières étapes du catabolisme de la bétaine, ou
35 éventuellement les deux premières étapes simultanément.

Préférentiellement, les cellules de l'invention sont des cellules productrices de métabolites et/ou d'enzymes. A cet égard, il peut également s'agir de cellules recombinées productrices de métabolites et/ou d'enzymes, c'est-à-dire de cellules modifiées par les techniques de l'ADN recombinant en vue d'améliorer leur capacité de production (Cf. notamment WO 91/11518, EP 346000). Encore plus préféren-
5 tiellement, les cellules de l'invention sont choisies parmi les cellules du genre *Pseudomonas*, *Streptomyces*, actinomycètes, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clostridium* et *Methanobacterium*.

10 Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation de cellules présentant une modification d'un gène au moins impliqué dans le catabolisme de la bétaine, utilisables dans des conditions industrielles de fermentation.

La présente invention décrit en effet l'identification, l'isolement et la caractérisation de fragments d'ADN contenant des gènes impliqués dans le catabolisme de la bétaine. Ces fragments permettent maintenant de préparer des
15 cellules spécifiquement modifiées au niveau du catabolisme de la bétaine. Il est en effet possible de modifier *in vitro* les fragments décrits pour les rendre non fonctionnels et de les réintroduire dans une cellule déterminée, dans laquelle ils vont se substituer par double recombinaison homologue à la copie génomique fonctionnelle
20 correspondante. Il est également possible, sur la base des fragments ainsi isolés, d'élaborer des sondes qui s'intégreront dans le génome d'une cellule désirée, spécifiquement dans le gène correspondant.

Plus particulièrement, le procédé de l'invention consiste à remplacer le ou les gènes chromosomiques considérés par des versions modifiées *in vitro*.

25 Un autre objet de l'invention concerne un fragment d'ADN portant un gène au moins du catabolisme de la bétaine.

Plus particulièrement, la présente invention est illustrée par l'isolement et la caractérisation de fragments d'ADN de *Pseudomonas denitrificans* complétant les mutants bloqués dans le catabolisme de la glycine bétaine en diméthylglycine et ceux
30 bloqués dans le catabolisme de la diméthylglycine en sarcosine ; c'est-à-dire les fragments d'ADN contenant des gènes impliqués dans la dégradation de la glycine bétaine en diméthylglycine et de la diméthylglycine en sarcosine. Les fragments d'ADN selon la présente invention ont été isolés à partir d'une souche de *Pseudomonas denitrificans* SC510, dérivée de la souche MB580 (brevet US
35 3 018 225). Ces fragments ont été obtenus par :

(i) préparation de mutants bloqués dans le catabolisme de la bétaine. Différentes techniques déjà mentionnées plus haut sont utilisables à cet effet. La sélection des mutants se fait par culture sur milieu approprié et dosage, selon les techniques classiques pour l'homme du métier, de la bétaine ou des produits de son catabolisme.

5 (ii) complémentation de ces mutants avec l'acide nucléique d'un microorganisme capable de cataboliser la bétaine,

(iii) sélection des mutants complémentés, puis isolement et caractérisation de l'acide nucléique ayant permis cette complémentation, qui porte donc des gènes du catabolisme de la bétaine.

10 Il est clair que, à partir des fragments d'ADN identifiés et isolés dans la présente demande, l'homme du métier peut, notamment par des expériences d'hybridation, isoler et cloner des gènes du catabolisme de la bétaine à partir d'autres sources cellulaires.

15 Plus préférentiellement, il s'agit donc du gène codant pour la bétaine-homocystéine méthyltransférase, sur lequel une modification selon l'invention induit dans la cellule une diminution de l'activité bétaine-homocystéine méthyltransférase. Toujours préférentiellement, il s'agit du gène codant pour la diméthylglycine déshydrogénase, sur lequel, une modification selon l'invention induit dans la cellule une diminution de l'activité diméthylglycine déshydrogénase.

20 Un autre objet de l'invention concerne un procédé amélioré de production métabolites ou d'enzymes par culture d'une cellule productrice dudit métabolite ou enzyme, modifiée au niveau de son catabolisme de la bétaine, dans des conditions de production, puis récupération dudit métabolite ou enzyme.

25 Selon un premier mode de réalisation, la cellule productrice présente une modification au moins au niveau d'un gène impliqué dans le catabolisme de la bétaine et dégrade moins rapidement la bétaine.

Préférentiellement, selon le premier mode de réalisation, la ou les modifications sont stables ségrégationnellement et/ou non réversibles.

30 Dans une variante préférée de l'invention, la ou les modifications sont des délétions et/ou des insertions mutationnelles.

Selon un deuxième mode de réalisation, un gène au moins de la cellule productrice, impliqué dans le catabolisme de la bétaine, est amplifié et ladite cellule dégrade plus rapidement la bétaine.

Le procédé de l'invention est particulièrement adapté à la production de métabolites tels que les acides aminés, les vitamines, les antibiotiques, leurs dérivés ou leurs précurseurs.

Le procédé de l'invention peut notamment permettre la production améliorée
5 de cobalamine, et de préférence de vitamine B12.

La présente invention est complétée par les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les
10 extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli* etc, sont bien
15 connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs
20 (Biolabs), ou Pharmacia et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322 et pUC sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un
25 mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Boehringer) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E.coli* selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN
30 Polymérase du phage T4 utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764].

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de
5 PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode
10 développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** (1977) 5463-5467].

ABREVIATIONS

Bétaïne : glycine bêtaïne ou N, N, N-triméthylglycine

CLHP : chromatographie liquide haute pression

DMG : diméthylglycine

15 kb : kilobase

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Voie de dégradation de la glycine bêtaïne en glycine. Trois déméthylations successives ont lieu, la glycine bêtaïne est catabolisée en diméthylglycine qui est dégradée en sarcosine elle-même dégradée en glycine.

20 Figure 2 : Courbe de croissance en milieu minimum M. La souche non mutée SBL27 Riff^r et les mutants G3728 et G3900 sont cultivés en milieu minimum M en présence de glycine bêtaïne comme source de carbone, leur croissance est représentée sur l'axe des ordonnées en nombre de cellules par ml, en fonction du temps en jours décrit sur l'axe des abscisses.

25 Figure 3 : Cartographie du fragment d'ADN de *P. denitrificans* complémentant les mutants G3728, G3736, G3899 et G3900. Sur le fragment d'ADN sont indiqués les sites de restriction et la position de l'insertion du transposon des mutants correspondant G3728, G3899 et G3900. Au dessous du fragment sont représentés les inserts des plasmides pXL2100, pXL2101, pXL2105 et pXL2107 qui ont été utilisés
30 pour compléter les mutants. + complémentation, - pas de complémentation.

Figure 4 : Cartographie du fragment d'ADN de *P. denitrificans* complémentant les mutants G3727 et G3738. Sur le fragment d'ADN sont indiqués les sites de restriction et la position de l'insertion du transposon de G3738. Au dessous du fragment figure

une partie des inserts des plasmides pXL19E2, pXL17A10, et pXL13C5 qui ont été utilisés pour compléter les mutants. + complémentation, - pas de complémentation.

EXEMPLE 1- Isolement de mutants de Pseudomonas denitrificans bloqués dans le catabolisme de la glycine bêtaïne.

Cet exemple décrit l'isolement de mutants de Pseudomonas denitrificans bloqués dans le catabolisme de la glycine bêtaïne en diméthylglycine et sarcosine. Ces mutants ont été isolés à partir d'une banque de mutants dans laquelle le transposon Tn5Sp^r est inséré dans le génome de la souche Pseudomonas denitrificans SBL27 Rif^r. Cette banque a été réalisée de la façon suivante : Un plasmide, désigné pRK2013::Tn5Sp^r, a été construit en insérant le gène de résistance à la spectinomycine Sp^r issu du plasmide pHP45Ω (Prentki et al., 1984) au site BamHI du transposon Tn5 (Berg et al., 1983) cloné dans le plasmide pRK2013::Tn5 (Ditta et al., 1980). Une conjugaison a ensuite été réalisée en mélangeant les cultures en phase exponentielle de SBL27Rif^r et E.coli MC1060 (pRK2013::Tn5Sp^r). Les transconjugants Rif^rSp^r ont été obtenus après incubation à 30°C pendant 5 jours, à la fréquence de 10⁻⁸ clones par cellule réceptrice. Il a été vérifié pour 12 clones que le plasmide introduit avait bien été perdu (l'ADN plasmidique a été préparé puis introduit dans E.coli par transformation; aucun clone portant la résistance du plasmide n'a été obtenu) et que le transposon Tn5Sp^r était bien intégré dans le génome de SBL27Rif^r (par southern comme cela est décrit dans l'exemple 2).

Environ 3000 mutants de cette banque ont été réisolés sur milieu minimum M (1 g/l NH₄Cl, 7 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 10 mg/l thiamine) solide (15 g/l d'agar Difco) où la source de carbone est la glycine bêtaïne à 10 g/l puis incubés à 30°C pendant 3 jours. Ensuite, la bêtaïne, la diméthylglycine et la sarcosine ont été dosées dans le surnageant de culture après séparation par CLHP (colonne : Shodex Ionpak S 801 P, longueur 50 cm, diamètre 8 mm ; température: 70°C ; phase mobile : 0,01M azoture de sodium) et détection par réfractométrie différentielle.

Dix-huit mutants se sont révélés ne plus utiliser la bêtaïne comme source de carbone, ce sont G3727 à G3731, G3733 à G3742 et G3897, G3899 et G3900.

D'autre part lorsque ces mutants sont cultivés, selon le protocole déjà décrit (Cameron et al, 1989), dans 10 ml de milieu PS4 pendant 5 jours à 30°C, de la bêtaïne, ou de la diméthylglycine ou de la sarcosine peuvent être mesurées dans le

5 surnageant de culture après séparation par CLHP et détection par réfractométrie différentielle. De la bétaine est détectée dans le surnageant du moût des mutants G3728, G3736, G3897, G3899 et G3900 (entre 53 et 98 % de la bétaine contenue dans le milieu initial) ; alors qu'avec les mutants G3727, G3738 et G3742 c'est de la diméthylglycine (environ 88 à 97 % de la bétaine contenue dans le milieu initial) ; avec
les mutants G3729, G3730, G3731, G3733, G3737 et G3741 c'est de la sarcosine (environ 64 à 75 % de la bétaine introduite dans le milieu); avec les autres mutants G3734, G3735, G3739, G3740 et avec la souche non mutée aucun des trois produits n'est observé, voir tableau 1.

10 De plus, seuls SBL27 Rif^r et les mutants G3728, G3736, G3897, G3899 et G3900 poussent sur milieu minimum M solide où la source de carbone est la diméthylglycine (10 g/l). Des cultures en milieu minimum M, liquide, où la source de carbone est la glycine bétaine à 10 g/l, sont réalisées comme suit : à partir d'un réisolement sur milieu riche LB (Cameron et al, 1989), la souche est cultivée dans
15 5 ml de milieu LB à 30°C pendant 12 heures ; les cellules de cette préculture sont lavées en milieu minimum M, puis des inoculums de 0,2 % sont ensemencés, dans huit Erlenmeyers de 250 ml contenant 25 ml de milieu minimum M où la source de carbone est la glycine bétaine (10 g/l), et incubés sous agitation à 250 rpm, à 30°C. Aux jours 3, 4, 5, 6, 10, 14, 21, les cellules contenues dans un Erlenmeyer sont
20 comptées après étalement et croissance sur milieu minimum solide où la source de carbone est la glycine bétaine. Lorsque les mutants G3728 et G3900 sont cultivés en milieu minimum liquide où la source de carbone est la glycine bétaine (10 g/l), pendant les trois premiers jours, aucune croissance n'est observée alors qu'avec la souche SBL27 Rif^r la phase stationnaire est déjà atteinte, voir figure 2 ; cependant au
25 sixième jour une phase stationnaire comparable à celle de SBL27 Rif^r est observée. Ce résultat montre que les mutants qui ne dégradent pas toute la bétaine (10 g/l) contenue dans le milieu PS4, voir tableau 1, sont capables de l'utiliser, mais après une phase de latence de 3 jours par rapport à la souche non mutée, comme source de carbone dans un milieu minimum contenant 10 g/l de bétaine.

30 Ces données physiologiques permettent de mettre en évidence chez Pseudomonas denitrificans SBL27 Rif^r une voie de dégradation de la glycine bétaine en diméthylglycine et sarcosine où :

1) l'étape de dégradation de la glycine bétaine en diméthylglycine est bloquée (ou partiellement bloquée) chez les mutants G3728, G3736, G3897, G3899 et G3900 ;

2) l'étape de dégradation de la diméthylglycine en sarcosine est bloquée chez les mutants G3727, G3738 et G3742 ;

3) l'étape de dégradation de la sarcosine est bloquée chez les mutants G3729, G3730, G3731, G3733, G3737 et G3741.

5 **EXEMPLE 2 - Caractérisation génétique des mutants de Pseudomonas denitrificans bloqués dans le catabolisme de la bétaine.**

Cet exemple décrit les expériences de biologie moléculaire permettant de classer et caractériser les mutants à l'aide de leur transposon. Le génotype de chaque mutant est analysé par Southern (Maniatis et al, 1982) de la façon suivante : l'ADN
10 génomique de chaque mutant (G3727 à G3731, G3733 à G3742 et G3897, G3899 et G3900) a été préparé puis une aliquote est digérée par l'enzyme de restriction EcoRI ; les fragments ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose puis sont transférés sur une membrane Biodyne; cette membrane est alors hybridée avec
15 l'un des plasmides suivants marqué au $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Ces plasmides sont pT27, pT28, pT30, pT31, pT34, pT35, pT36, pT37, pT38, pT39, pT40, pT42, pT97, pT00. Ces plasmides ont été obtenus par insertion au site EcoRI du vecteur pRK290 de l'unique fragment EcoRI génomique dans lequel est inséré le transposon Tn5Sp^r des mutants
20 G3727, G3728, G3730, G3731, G3734, G3735, G3736, G3737, G3738, G3739, G3740, G3742, G3897, G3900 respectivement. Les plasmides pT portant le fragment EcoRI recherché sont sélectionnés par leur résistance à la spectinomycine, conférée par le transposon. En hybridant la membrane par exemple avec le plasmide pT27, l'ADN génomique des mutants G3727 et G3738 ne présente qu'une seule bande radioactive correspondant à un fragment EcoRI de poids moléculaire d'environ 16 kb, ce qui indique que, dans ces mutants, le transposon est inséré au même endroit. En
25 revanche, pour la souche non mutée, le fragment hybridant est de 8 kb et avec tous les autres mutants deux fragments hybrident, l'un comigre avec celui de la souche non mutée et l'autre possède une taille variable supérieure à la taille du transposon (8 kb) (de Bruijn, 1987 ; Prentki, 1984). Les hybridations successives avec chacun des plasmides ont permis de regrouper les mutants par classes d'hybridation de 1 à 12,
30 voir tableau 1.

D'autre part les plasmides pT27, pT28, pT30, pT31, pT34, pT36, pT37, pT38, pT97, pT00 ont été utilisés pour réintroduire par double recombinaison homologue la mutation provenant de l'insertion du transposon, dans la souche non mutée SBL27 Rif^r, selon un protocole déjà décrit (Cameron et al, 1991). Pour les

souches ainsi obtenues par disruption génique, le génotype a été vérifié par Southern comme cela vient d'être décrit dans le paragraphe précédent ; et le phénotype a été déterminé après analyse des composés détectés dans le surnageant des cultures en milieu PS4 comme décrit dans l'exemple 1.

5 Pour toutes les souches obtenues par disruption génique, qui conduisent au même phénotype que les souches mutées initiales, voir tableau 1, les quantités des composés détectés sont comparables. Ces souches appartiennent:

- 1) soit à la classe d'hybridation 5 et accumulent de la bétaine,
- 2) soit à la classe d'hybridation 2 et accumulent de la diméthylglycine,
- 10 3) soit à la classe d'hybridation 4 et accumulent de la sarcosine.

De plus, une délétion d'un fragment génomique BglII de 10 kb et insertion d'une cassette de résistance à la spectinomycine ont été réalisées à partir du plasmide pT28. La souche, dont le génotype a été vérifié par Southern (comme cela est décrit dans le premier paragraphe de cet exemple) présente le même phénotype
15 d'accumulation de bétaine que les souches décrites dans la classe d'hybridation 5.

Tableau 1. Classification des mutants bloqués dans le catabolisme de la bétaine en sarcosine.

Souches n° G	Classes d'hybridation	Composés détectés chez les souches	
		mutants initiaux	disruptants génétiques
3727	2	DMG 88 %	DMG
3728	5	Bétaine 53 % sarcosine 13%	Bétaine
3729	3	Sarcosine 68 %	ND
3730	3	Sarcosine 69 %	0
3731	4	Sarcosine 64 %	Sarcosine
3733	4	Sarcosine 69 %	ND
3734	7	0	0
3735	8	0	ND
3736	1	Bétaine 62 %	0
3737	4	Sarcosine 75 %	Sarcosine
3738	2	DMG 91 %	DMG
3739	9	0	ND
3740	10	0	ND
3741	4	Sarcosine 64 %	ND
3742	11	DMG 97 %	ND
3897	12	Bétaine 96 %	0
3899	5	Bétaine 95 %	ND
3900	5	Bétaine 98 %	Bétaine

EXEMPLE 3 - Complémentation de mutants de Pseudomonas denitrificans bloqués dans les étapes de déméthylations de la glycine bétaine en sarcosine.

Cet exemple décrit l'isolement de fragments d'ADN de P.denitrificans portant des gènes impliqués dans la dégradation de la bétaine en sarcosine. Ces fragments ont été mis en évidence par des expériences d'hybridation, en utilisant l'insert des plasmides pT28 ou pT38 comme sonde et la banque de plasmides contenant des fragments Sau3AI de l'ADN de P.denitrificans clonés dans pXL59 (Cameron et al, 1989). Les inserts des plasmides hybridant avec la sonde ont été cartographiés. Des clones ou des sous-clones, qui ont été construits (Maniatis et al, 1982) dans les

vecteurs dérivés de RSF1010 (Cameron et al, 1989), ont été introduits par conjugaison (Cameron et al, 1989) chez les mutants bloqués dans le catabolisme de la bétaine en diméthylglycine ou chez les mutants bloqués dans la dégradation de la diméthylglycine en sarcosine. La complémentation des mutants par les clones ou les sous-clones a été déterminée par l'absence d'accumulation de la bétaine, diméthylglycine ou sarcosine dans le surnageant de culture des souches transconjuguants cultivées en milieu PS4, comme décrit dans l'exemple 1.

3-1 Fragment d'ADN de P.denitrificans portant des gènes impliqués dans la dégradation de la bétaine en diméthylglycine.

Les clones hybridant avec pT28 ont été introduits chez les mutants G3728, G3736, G3897, G3899 et G3900 bloqués dans le catabolisme de la bétaine en diméthylglycine. Comme cela est présenté sur la figure 3, deux sous-clones pXL2105 et pXL2107 contenus sur le fragment EcoRI de 12 kb complètent quatre mutants parmi les cinq G3728, G3736, G3899 et G3900. L'un des sous-clones pXL2105 contient un fragment SstI-XhoI de 3,4 kb cloné dans le vecteur pXL435 (Cameron et al, 1989) et complémente deux mutants G3900 et G3899 ; l'autre pXL2107 contient un fragment BamHI-EcoRI de 4 kb cloné dans pKT230 (Cameron et al, 1989) et complémente les mutants G3728 et G3736. D'autre part l'insertion du transposon chez les mutants G3728, G3899 et G3900 a bien été cartographiée sur ce fragment EcoRI de 12 kb ; ce qui n'est pas observé chez le mutant G3736, il se peut que le phénotype de ce mutant ne soit pas corrélé à la position du transposon, puisque le mutant obtenu après génétique reverse n'accumule pas de bétaine, voir l'exemple 2. Par conséquent au moins deux gènes sont impliqués dans l'étape de dégradation de la bétaine en diméthylglycine.

3-2 Fragment d'ADN de P.denitrificans portant des gènes impliqués dans la dégradation de la diméthylglycine en sarcosine.

Les clones hybridant avec pT38 ont été introduits chez les mutants G3727, G3738 bloqués dans le catabolisme de la diméthylglycine en sarcosine. Comme cela est présenté sur la figure 4, deux clones issus de la banque et se cartographiant sur un fragment EcoRI-EcoRI-EcoRI de 14,5 kb complémente G3727 et G3738. L'un des sous-clones pXL19E2 contient un fragment EcoRI de 6,6 kb et l'autre pXL13C5 contient le fragment EcoRI-EcoRI-EcoRI de 14,5 kb. Par conséquent au moins un

gène, cartographié sur le fragment décrit sur la figure 4, est impliqué dans l'étape de dégradation de la diméthylglycine en sarcosine.

EXEMPLE 4 - Amélioration de la production de vitamine B₁₂ chez une souche Pseudomonas denitrificans modifiée dans le catabolisme de la glycine bêtaïne.

5 Cet exemple illustre l'amélioration de la production de cobalamines d'une souche productrice de cobalamines par disruption de gènes impliqués dans le catabolisme de la bêtaïne en diméthylglycine.

La mutation, qui est responsable du phénotype du mutant G3728 (ou G3900), est générée par le transposon qui est cartographié sur le fragment EcoRI,
10 cloné dans le pT28 (ou pT00) et décrit dans l'exemple 2. Cette mutation a été introduite par double recombinaison homologue dans la souche de P.denitrificans SC510 Rif^r, productrice de cobalamines (Cameron et al, 1991). Pour les deux souches ainsi obtenues SC510 Rif^r::pT28 et SC510 Rif^r::pT00 par génétique réverse, le génotype a été vérifié par Southern comme décrit dans l'exemple 2, et la production
15 de cobalamines a été déterminée après analyse par CLHP (colonne : Asahibak OD50, longueur : 15 cm, diamètre : 6 mm, phase mobile : acétonitrile/ 0,1 M cyanure de potassium) et détection ultraviolette (longueur d'onde : 365 nm) de la vitamine B₁₂ contenue dans les cultures des souches poussées pendant sept jours à 30°C dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 25 ml de milieu PS4 où la glycine bêtaïne est à
20 2 mg/l, selon un protocole déjà décrit (Cameron et al, 1989). Les résultats de ces dosages sont indiqués dans le tableau 2, ils représentent la valeur moyenne obtenue pour deux cultures dans les quatre expériences faites indépendamment.

Dans les conditions de culture utilisées, la production de cobalamines est augmentée d'un facteur 10, par rapport à la souche SC510Rif^r, chez les souches
25 mutées dans un fragment génomique EcoRI de 13 kb, voir figure 3, dont l'ADN code pour des gènes impliqués dans le catabolisme de la bêtaïne en diméthylglycine. Ces résultats montrent clairement qu'en modifiant le catabolisme de la bêtaïne des souches de l'invention, leur capacité de production de métabolites a été augmentée.

Tableau 2. Production de vitamine B₁₂ chez les souches mutées dans le fragment EcoRI portant des gènes impliqués dans le catabolisme de la bétaine en diméthylglycine. Les niveaux de production des souches modifiées sont donnés par rapport à la production de la souche Sc510 Rif^r, qui a été arbitrairement fixée à 1.

5

Souches / Expérience	1	2	3	4
Sc510 Rif ^r	1	1	1	1
SC510 Rif ^r ::pT28	10,5	11	22	14,5
SC510 Rif ^r ::pT00	11	8		

Références bibliographiques

- Berg D. et al., 1983, Bio/Technology 1 :417-435
- F. de Bruijn. 1987. Methods in Enzymology.154 : 175-156.
- B. Cameron, K. Briggs, S. Pridmore, G. Brefort and J. Crouzet. 1989. J. Bacteriol.
10 171:547-557.
- B. Cameron, C. Guilhot, F. Blanche, L. Cauchois, M. Rouyez, S. Rigault, S. Levy-Schil and Crouzet. 1991. J. Bacteriol. 173:6058-6065.
- S. Cayley, B. Lewis and T. Record. 1992. J. Bacteriol. 174:1586-1595.
- L. Csonka. 1989. Microbiol. Rev. 53:121-147.
- 15 Ditta, G. et al., 1980, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77 : 7347-7351.
- J. Graham and B. Wilkinson. 1992. J. Bacteriol. 174:2711-2716.
- T. Maniatis, E. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- A. Oren. 1990. Antonie van Leeuwenhoek 58:291-298.
- 20 P. Prentki and H. Krisch. 1984. Gene. 29:303-313.
- Rothstein 1983, Meth. Enzymol. 101 202.
- L. Smith, J. Pocard, T. Bernard, D. Le Rudulier. 1988. J. Bacteriol. 170: 3142-3149.
- R. White and A. Demain. 1971. Biochim. Biophys. Acta. 237:112-119.

REVENDICATIONS

1. Procédé microbiologique de production de métabolites et/ou enzymes par culture d'une cellule productrice dudit métabolite et/ou enzyme dans des conditions de production puis récupération dudit métabolite et/ou enzyme, caractérisé en ce que la
5 cellule productrice présente une modification au moins au niveau d'un gène impliqué dans le catabolisme de la bétaine.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce la ou les modifications sont des substitutions et/ou des insertions et/ou des délétions d'une ou plusieurs bases et/ou des disruptions, et en ce que la cellule dégrade moins rapidement la bétaine.

10 3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que la modification est stable ségrégationnellement et/ou non réversible.

4. Procédé selon les revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que la ou les modifications portent sur la partie codante du ou desdits gènes et/ou sur les régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle desdits gènes.

15 5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que un gène au moins impliqué dans le catabolisme de la bétaine est amplifié et en ce que la cellule dégrade de ce fait plus rapidement la bétaine

6. Procédé selon les revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la cellule est choisie parmi les cellules du genre Pseudomonas, Streptomyces, Actinomycetes,
20 Propionibacterium, Corynebacterium, Bacillus, Escherichia, Salmonella, Rhizobium, Agrobacterium, Rhodopseudomonas, Xanthomonas, Clostridium et Methanobacterium.

7. Procédé selon les revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le métabolite est choisi parmi les acides aminés, les vitamines, les antibiotiques, leurs dérivés ou
25 leurs précurseurs.

8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le métabolite est une cobalamine, et de préférence la vitamine B12.

9. Cellule caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule recombinée productrice de métabolites et/ou d'enzymes et en ce qu'elle présente une modification au moins au niveau d'un gène impliqué dans le catabolisme de la bétaine.

- 5 10. Utilisation d'une cellule productrice de métabolites et/ou d'enzymes présentant une modification au moins au niveau d'un gène impliqué dans le catabolisme de la bétaine, pour la production de métabolites et/ou enzymes.

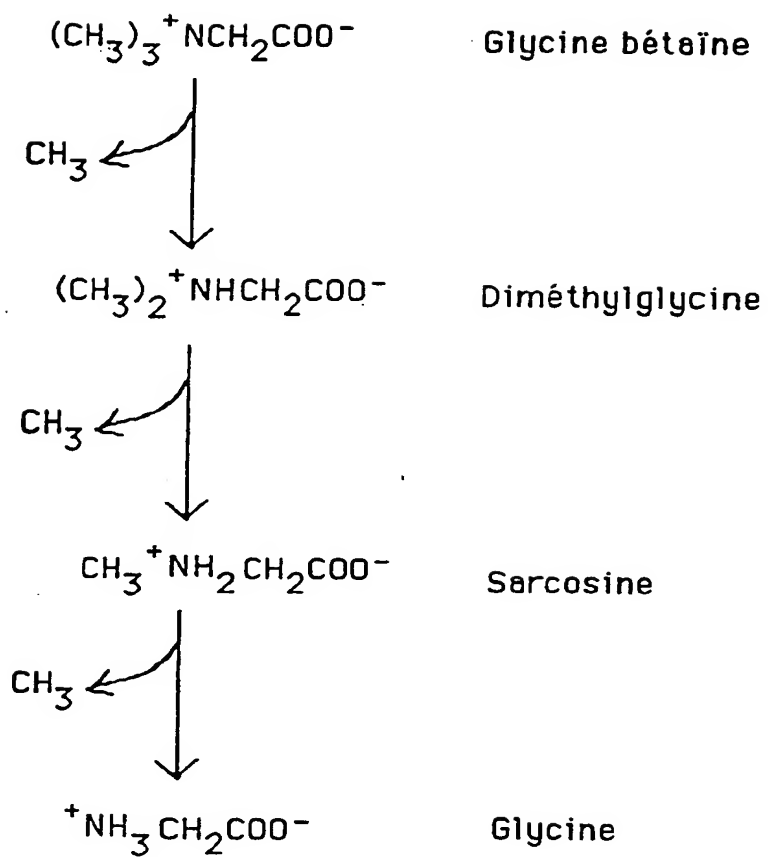


Figure 1

2/4

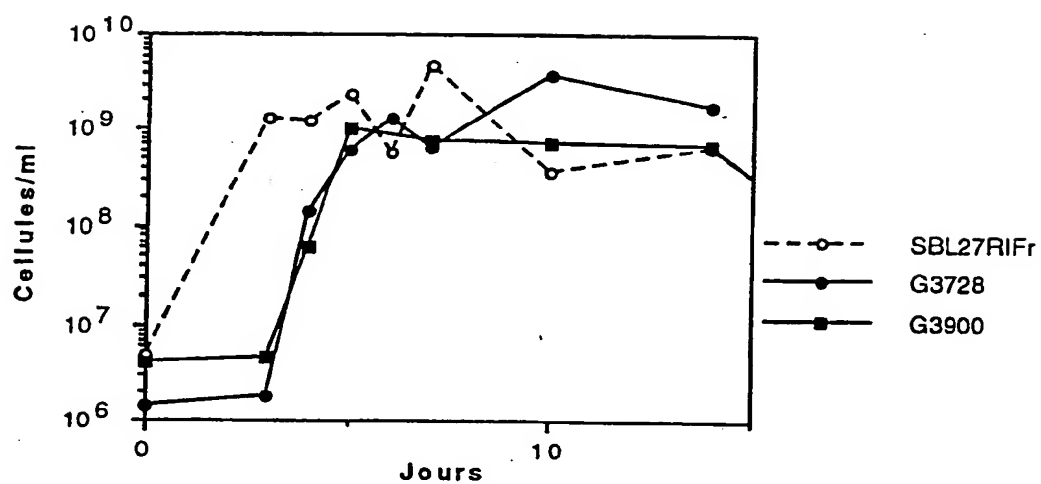


Figure 2

3/4

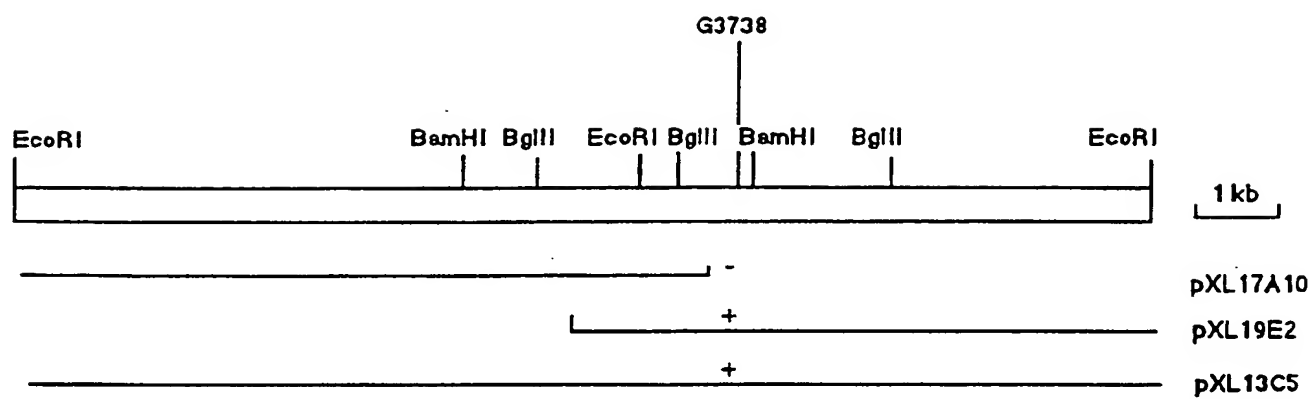


Figure 4

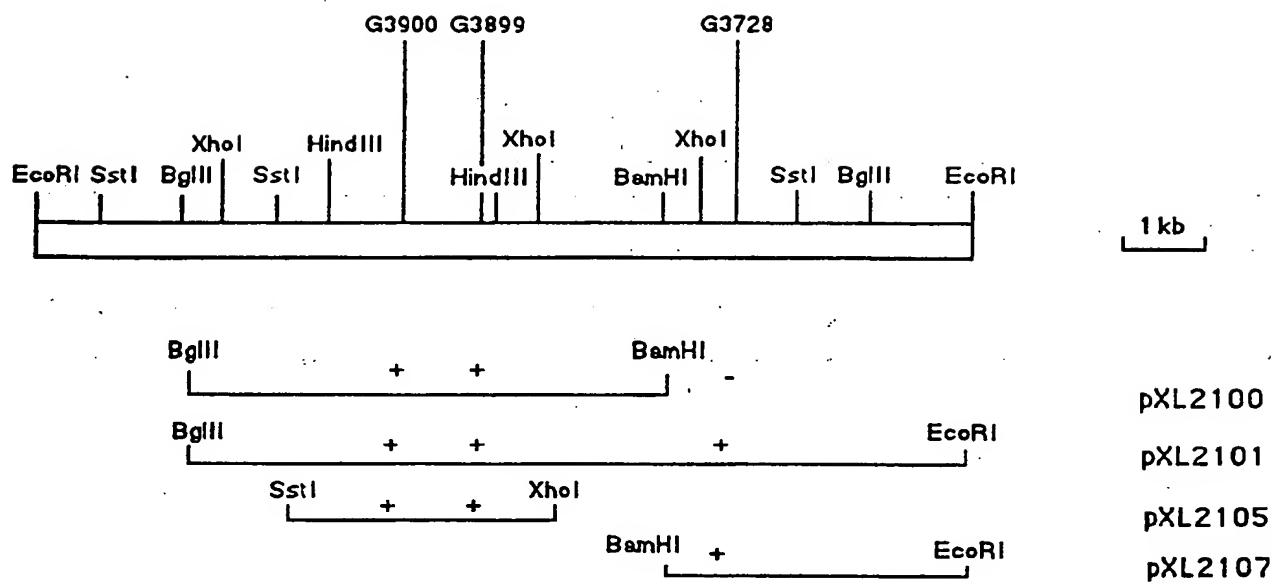


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 93/01202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/52 C12N15/68 C12N15/74 C12P19/42 C12N1/21
//(C12N1/21,C12R1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X Y	EP,A,0 543 344 ((LONZA AG)) 26 May 1993 see page 5, line 31 - page 6, line 5 ---	1-6,9,10 7,8
Y	DATABASE WPI Week 9134, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-252650 & WO,A,91 11518 (RHONE POULENC BIOCHIMIE) 8 August 1991 see abstract --- -/--	7,8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 1994

Date of mailing of the international search report

04-03-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/01202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 173, no. 19, October 1991, AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US; pages 6058 - 6065 B. CAMERON ET AL. 'Genetic and sequence analyses of a Pseudomonas denitrificans DNA fragment containing two cob genes' cited in the application see page 6058, right column, paragraph 3 - page 6063, right column, paragraph 1 ----	1-10
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 171, no. 1, January 1989, AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US; pages 547 - 557 B. CAMERON ET AL. 'Cloning and analysis of genes involved in Coenzyme B12 biosynthesis in Pseudomonas denitrificans' cited in the application see page 547, right column, paragraph 2 - page 551, left column, paragraph 2 ----	1-10
A	DATABASE WPI Week 8104, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 81-04653D & JP,A,55 148 084 (MITSUBISHI GAS CHEM IND) 19 November 1990 see abstract ----	1-10
A	DATABASE WPI Week 8737, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-261317 & JP,A,62 181 791 (AJINIMOTO KK) 10 August 1987 see abstract -----	1-10

Information on patent family members

PCT/FR 93/01202

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 93/01202

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 5 C12N15/52 C12N15/68 C12N15/74 C12P19/42 C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:38)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 5 C12N C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X Y Y	EP, A, 0 543 344 ((LONZA AG)) 26 Mai 1993 voir page 5, ligne 31 - page 6, ligne 5 --- DATABASE WPI Week 9134, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-252650 & WO, A, 91 11518 (RHONE POULENC BIOCHIMIE) 8 Août 1991 voir abrégé --- -/--	1-6, 9, 10 7, 8 7, 8
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>* "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>* "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>* "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>* "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>* "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>* "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>* "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>* "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>* "&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 17 Février 1994		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale '04 -03- 94
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Hornig, H

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 173, no. 19, Octobre 1991, AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US; pages 6058 - 6065 B. CAMERON ET AL. 'Genetic and sequence analyses of a Pseudomonas denitrificans DNA fragment containing two cob genes' cité dans la demande voir page 6058, colonne de droite, alinéa 3 - page 6063, colonne de droite, alinéa 1 ---</p>	1-10
A	<p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 171, no. 1, Janvier 1989, AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US; pages 547 - 557 B. CAMERON ET AL. 'Cloning and analysis of genes involved in Coenzyme B12 biosynthesis in Pseudomonas denitrificans' cité dans la demande voir page 547, colonne de droite, alinéa 2 - page 551, colonne de gauche, alinéa 2 ---</p>	1-10
A	<p>DATABASE WPI Week 8104, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 81-04653D & JP,A,55 148 084 (MITSUBISHI GAS CHEM IND) 19 Novembre 1990 voir abrégé ---</p>	1-10
A	<p>DATABASE WPI Week 8737, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-261317 & JP,A,62 181 791 (AJINIMOTO KK) 10 Août 1987 voir abrégé -----</p>	1-10

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 93/01202

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)